jp58149645/pn

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX (C) 2002 THOMSON DERWENT

ACCESSION NUMBER: 1983-786657 [41] WPINDEX

DOC. NO. CPI: C1983-098779

TITLE: Protein gel prodn. - by addn. of trans-glutaminase to

protein soln. to effect crosslinking.

DERWENT CLASS: D13

PATENT ASSIGNEE(S): (AJIN) AJINOMOTO KK

COUNTRY COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN	IPC	_
JP 58149645 JP 01050382			•		7			<

## APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 58149645	A	JP 1982-31978	19820301

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1982-31978 19820301 INT. PATENT CLASSIF.: A23J003-00; A23L001-04 BASIC ABSTRACT:

JP 58149645 A UPAB: 19930925

In the prodn. of protein gel, at least 1 unit of (1) transglutaminase per 1 g of protein is added to (2) protein soln. contg. at least 2 wt.% of protein

Crosslinking is effected by (1) between glutamine radicals and lysine radicals resulting in gelation of (2). The protein may be plant protein, e.g. soybean protein, or animal protein e.g. milk protein, gelatin, collagen, etc. Protein concn. of (2) is pref. 5-15 wt.%. Starch, sugar, spices, etc. may be present in (2) so long as they do not hinder gelation by (1). (1) is prepd. from a marmot liver.

Protein from a variety of sources can be gelled into food, etc.

0/0

FILE SEGMENT: CPI FIELD AVAILABILITY: AB

MANUAL CODES: CPI: D03-F06

## (9) 日本国特許庁 (JP)

10 特許出願公開

# ⑩公開特許公報 (A)

昭58-149645

⑤ Int. Cl.³A 23 J 3/00

識別記号

庁内整理番号 7915-4B **33公開** 昭和58年(1983)9月6日

発明の数 1 審査請求 未請求

(全 7 頁)

## 69ゲル化物の製造法

2)特

面 昭57-31978

②出 願 昭57(1982)3月1日

份発 明 者 本木正雄

横浜市金沢区釜利谷町1915-59

70発 明 者 丹尾式希

川崎市川崎区観音 2 - 20-8

⑫発 明 者 滝波弘一

横浜市港北区篠原台町 3 —16—

310

⑪出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8

号

明 綱 書

- 1 発明の名称 ゲル化物の製造法
- 2 特許請求の範囲

蛋白質濃度2重量多以上の蛋白含有溶液に、 トランスグルタミナーゼを蛋白19に対して1 ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能特性が乏しい等の理由から利用が制限されて組織化食品に適するような機能性、栄養性をなら、機化食品に適する技術が確立される品質するだけでなく、高品質が増加するだけでなく、高品質の調査を作りうる。改質技術の一つとして解素の利用度が増加するが、現状では加水分解等素による改質が主なものであり、他の酵素の利用のは少ない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるトランスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量の多いダルタミン(Gin と略す)残基とリジン(Lys と略す)残基間に架橋を形成させ、ゲル状物質を製造できることを発見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は蛋白質濃度2重量多以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白19に対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質としては油糧種子の脱脂物(脱脂大豆)及びそれらより分離した蛋白質を挙げることができる。また、動物性蛋白質としては乳蛋白質、ゼラチン、コラーゲン等を例示することができる。

これらの蛋白質の2重量多以上の蛋白含有溶液を開製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いことが望ましく適常2重量多以上、好ましくは5重

量多ないし」 5 重量多であればよい。この場合、 級粉、多糖類、関味料、着色料、香辛料などの食 品能加物を配合することができる。これらの使用 量は、後のトランスグルタミナーゼによるゲル化 を阻害しない範囲で適宜選択して能加すればよい。 蛋白溶液の濃度が 2 重量多より少ない場合には、 溶液状態のまま、もしくは沈澱を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液のp H は 6 ないし 9 であれば好ましい。

この蛋白含有糖液にトランスグルタミナーゼを

蛋白」まに対して1コニット以上添加してゲル化させる。このトランスグルタミナーゼは
Connellan らの方法( Journal of Biological
Chemistry, 246(4), 1093(1971) ) に従って、モルモットの肝臓より調製される。即ち、モルモットの肝臓をショ業溶液に分散させたものを遠心分離し、上清液を回収し、これにジェチルフミノエチルセルロースカラムにて分画することによって、狙製トランスグルコシダーゼを得る。これを19硫酸プロタミンで沈澱させ、沈澱物を

の.0 1 Mとなるよう 酸ナトリウムを加え、酢酸にてpH.5.0 に調整し、 遠心分離する。得られた沈澱に 0.0 5 Mリン酸酸 衝液 (pH 6.5) 3 0 配添加しホモゲナイズする。 この懸濁液を違心分離し、その上清を 0.0 0 1 M リン酸級衝液 (pH 7.5) に対して透析し、これ を狙トランスダルタミナーゼ溶液として用いる方 法である。

これらの方法は、操作順序を変化させたり、 添加量、 濃度、 pH 値分離装置などを若干変えても差しつかえない。 このようにして得たトランスグルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法 ( Journal of Biological Chemistry, 193, 265 (1951))で、 酵素活性を N ーカルポペンゾキシーレーグルタミニルグリシンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキサム酸法 ( Journal of Biological Chemistry, 241(23), 5618 (1966))で 測定すれば、 調製した酵素剤の比活性は 6.0 ないし13.0 の範囲の値を示す。 また、電気泳動によつて分子量を測定すると 8.0 万

回収する。さらにこの沈澱物を 0.2 M Tris 一 酢酸酸衝液で洗浄後、 0.0 5 M 硫安 - 5 mM Tris ー HCl 製物液(2 m M エチレンジアミン4 酢酸(以下 E D T A と略す)を含む)を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸アンモニウム溶液(1 M EDTA を含む)を添加し違心分離を行ない、沈澱物を回収する。沈澱物を10 mM Tris ー 酢酸級衝液(1 m M EDTA、
0.1 6 M KClを含む)で溶解し、違心分離した上清液を10 %アガロース(Bio Gel A - 0.5 M)でゲル濾過し、精製されたトランスグルタミナーゼを得る。

他のトランスグルタミナーゼの調製法としては、Clarke らの方法(Archives of Biochemistry and Biophysics, 79, 338(1969))がある。即ち、モルモット肝3009に、0.25Mショ糖溶液600gを加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

ないし9.0万の範囲の値である。このトランスダルタミナーゼ溶液は一30℃程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が1ユニットより少ない場合には、高粘性の溶液となる。また、2000ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスグルクミナーゼで蛋白分子に GluーLys 架橋が生じることは知られている (J. E. Polk and J. S. Finlayson "Advances in Protects" Chematry, "Vol. 31 ed. 10 C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press Ing., New York, N. Y., 1977, p. 1.)が、高い蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルが GluーLys 架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスグルタミナーゼの反応部位となる

Lys 残蓄をアセチル化及びサクシェル化した αsl カゼインにトランスグルタミナーせを作 用させてもダル化しなかつた。

- ② 反応榕液中に、S~S還元剤であるジチオスレイトールを共存させて反応を行なわせているので、S~S結合を主体とするゲルではない。
- ③ 加熱・冷却して得られる通常のゼラチンゲルとトランスグルタミナーゼでゲル化させたセラチンゲルの各々の弾性率を測定したところ、通常のゼラチンが風度が高になったのでは温度が大力結合であれるとうでなく、この弱い結合が切りたのであるとうになったが、共力に温度が変化してある。これに温度が変化してある。これに温度が変化してある。これに温度が変化していまます。大力に温度が変化が、大力を生の変化していません。本の変化量は少なった。事実両方のゲルである事が示唆された。事実両方のゲルタミナーゼ

によるゲルは、そのままであるが通常のゼラ テンゲルは脊融した。

以上より、Glu - Lys 架橋によつてゲルが生成されており、S - S の架橋によるゲルではないと考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内にてゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白質と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度 のより強いゲルを作ることができる。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様 にヨーグルト、セリーなどとして用いることはも ちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであ るため、マイクロカブセルの素材、固定化酵素の 素材などとしても用いることができるものである。

## 実施例1

以下の方法によりトランスグルタミナーゼを調製した。モルモツト肝 8 0 0 g に冷 0.2 5 M ショ 糖溶液的 2 e 加え、 2 0 0 0 0 rpm、 2 分でホモゲイズし、遠心分離 ( 1 0 5,000 0× g、 5 C、 1時間)を行ない上荷を得た。

これを 5 mM ・トリス・塩酸最衡液(2 mM EDTA 含有、pH 7.6)で平衡化してある DEAE セルロールカラムに抵加・吸着させた後、 上記最衡液の食塩濃度を 0 M から 1.0 M まで変化 させる勾配溶離法で分画し、酵素活性の高い画分 を得た。

これをゆつくりと提押しながら1 系硫酸プロタミン40 Mを抵加し、遠心分離(1 4.600×9、15分、5 C) で沈澱を集め、これを0.2 Mトリス・酢酸緩衝液(pH 6.0) に懸濁、ホモゲイズして洗い、遠心分離(2,500×9、1分、5 C) で、沈澱を集めた。

この沈景より、 0.0 5 M 航安を含む 5 m M トリス塩酸最衡液 ( 2 m M B D T A 含有、 p H 7.5 )

を添加し、ホモゲイズすることによつて、トランスグルタミナーゼを抽出した。これを3度繰り返し、集めた抽出液を6mMトリス・コハク酸緩衝液(2mM EDTA含有、pH 6.0)で平衡化したカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、プロタミンを除去し、濃液に1M EDTA (pH 8.0) 2.4 x と破安 4 7.4 gを加え、よく攪拌した後に、違心分離(15.0000×g、10分、5 で)で沈澱を集めた。

これを10mMトリス・酢酸銀衝液(1mMEDTA 0.16MKC1 含有、pH 6.0)に溶解し、遠心分離(27.0000×1、30分、5℃)で難務物を除いた後、上濱を同じ緩衝液で平衡化している10%アガロース(Bio Gcl A ~ 0.5 M)でゲル確遇を行ない、活性の高い画分を集め、これを10~20町/元の濃度となるよう限外確過(UM-10、アミコン社製)で濃縮し、トランスグルタミナーゼ溶液とした。この溶液を一30で以下で凍結保存し、適時溶解し使用した(尚、これは常時5℃で操作し調製した。)。

表1 に示した基質蛋白にトランスグルタミナー せを作用させ、ゲル化物を得た。

<del>\*</del> 1

	Ħ	鉴	法	*	N	化
牛乳蛋白 ①はsl-カ ゼイン	カゼイに1e を を を が が が が が が が が で の た を が れ の た を れ の た と れ の た と れ の た と れ の た と れ の た た れ の た た れ の た た れ の た の を の で の の の で の の の で の の の で の の の で の の の の の の の の の の の の の	4.8 を A を M を M を M を M を M を M を M を M を M	整れに解液腫し附出の、か しよ従しとで、酸でものは で、酸でものなり、 で、なめ、 で、のでものは で、を ので、 ので、 ので、 ので、 ので、 ので、 ので、 ので、 ので、 ので、	トリス・ リカ m! 20 m! シール・ シール・ に スクロル・ スクロル・ スクロル・	- 塩酸 M CaC M ジ有、1 1 nd 3 7 に対し カンナー カンナー	ls、 t N T T T T T T T T T T T T T T T T T T
牛乳蛋白 ②Na - カゼ イネート	U Solac(	New Zea	陽化学(構及 land 入元・日成	得た。( 多の濃) ルタミ	旦し、 変でトゥ ナーゼ! して 0・	ランスグ を蛋白 1 0 9 ユニ

基質蛋白	與	整	法	4	ル	ſŁ
1157	温抽出脱線 素体を カブトで担 8.0 ) の 6.4 に乗り し、p H 7	行り、(1000年) 大り、(1000年) では、(1000年) では、(1000年) では、(1000年) では、(1000年)	出液をpH 能によつて 適心分離し 退結乾燥して	(2)に同じ		
④大豆蛋白 1 S ダロ ブリン	の素は製) スー塩酸 メルカブト p H 8.0 ) p H 6.4 に つて対象を を集め、H	がよりでは、 はいでは、 はいでは、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は	レー3のの ・ル・3のの ・ル・カークル ・ル・カークル ・ル・カート ・ル ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート ・ル・カート	(z)に同じ		
⑤分離状大 豆蛋白	「 アジプロ (相 <b>製</b> )	· ンS — 2	」(味の素	<b>②*</b> C同じ		

基質蛋白	润	整	法	7	N	化
⑥水抽出大 豆蛋白	低温抽出脱の素(機) の素(機) 遠心分離後 乾燥し、水	を水に駆 、上情を	<b>満慢</b> 枠し、 透析、凍結	② <b>た</b> 同じ		
少酸沈勝區 白 天前	離によつて p H 4.8 に を集め、上	を 0.0 3 ( 1 0 m / 一、機件 上産をしま 結乾燥し	Mトリスー M 2 ーメル 有、p H し、違心分 る。これを 生じた沈頼	②に同じ		
(8)大豆蛋白 粒子	丸大豆を水 後、ホモゲ 構過(20 離して蛋白 56-68	ナイザー Omesh 粒子とし	で <b>粉砕</b> し、 )し遠心分 た( <b>特開</b> 昭	(2)に同じ		
<b>④大豆鑑</b> 白 ∷ セル	(特公昭 5 方法)	6 - 3 1	095号の	(2)K同じ		

基質蛋白	調	整	- 法	4	øL	化
<b>(</b> 0セラチン	A ルク社製			よりに 塩CaCla CaCla アリれをチくしてえい でしてえい。	の前、100mm (10mm) (10mm	の ー 加力 イン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン・アン

3#(1 C. A. Zittle et al. J. Dlary Sci., 46,
1183(1963)

★2 V. H. Thanh et al. J. Agric. Food
Chem., 24(6), 1117(1976)

## 実施例 2

α<sub>s1</sub>カゼイン、Na - カゼイネート、大豆蛋白 1 1 S グロブリン、水抽出大豆蛋白、各々 5 0 0 mg を 0.1 M トリス塩酸緩衝液 ( 5 m M CaCl<sub>3</sub> 、 2 0 mM ジチオスレイトール含有、 pH 7.6 )

長 2

3.5 町に将解し、これに大豆油 1.5 型を加えて2000 rpm で 3 分間ホモゲナイズして乳化物を得た。これにトランスダルタミナーゼを蛋白 1 町に対して 0.0 g ユニット加えると即座にゲル化物を得た。

#### 実施例 3

αsl - カゼイン、大豆蛋白 1 1 S グロブリン及び大豆蛋白 7 S グロブリンの 2 , 5 , 1 0 重量 5 溶液を 0.1 Mトリス・塩酸緩衝液( 5 mM CaCls、2 0 mM ジナオスレイトール含有 p H 7.6 )で 0.5 ml作成し、 3 7 でで各々にトランスグルタミナーゼを蛋白 1 聊に対して 0.1 ユニットの割合で加えて、ゲル化するか否を判定し、表 2 の結果を得た。

麦 3

藤葉量(ユニツ) 番 白	6×10 <sup>-4</sup>	1×10 <sup>-8</sup>	0.01	0.05	1.0	2.0
5重量多 α <sub>81</sub> カゼイン	Δ	0	0	0	(O)	0
10重量多 11Sグロブリン	×	×	0	0	0	0

◎: 即座にゲル化した

〇:1時間以上にゲル化

△:ゲルするが弱いゲル

×:磨液のまま

## 実施例 5

5 mM Calls と 2 0 mM ジチオスレイトールを含んだ p H 7.0 ~ p H 9.0 のトリスー塩酸緩衝液を調整し、それを用いて、 5 重量 5 α all カゼイン溶液と 1 0 重量 5 大豆蛋白 1 1 S グロブリン溶液を各 0.8 mℓ ずつ作成し、トランスグルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.1 ユニット添加してゲル化するか否かを観察した。結果を表 4 に示す。

<b>基質濃度</b>	2.0 %	5.0 %	1 0.0 %
α 81 カゼイン	۵	0	0_
大豆蛋白118グロブリン	>	Δ	0
大豆蛋白 7 8 グロブリン	<b>&gt;</b> :	×	0

〇: ゲル化

△:弱いゲル

×:溶液のまま

## 実施例4

α a 1 カゼインの 5 重量 5 溶液と大豆蛋白 1 1 S グロブリンの 1 0 重量 5 溶液を 0.1 Mトリスー塩酸緩衝液(5 mM CaCl a、 2 0 mM ジチオスレイトール含有、 p H 7.5 )で調整し、これら溶液 0.8 ㎡に対して、トランスグルタミナーゼを蛋白 1 習あたり 5 × 1 0 <sup>-4</sup> ~ 2.0 ユニット添加してゲル化するか否かを観察したところ、表 3 に示すよ 5 な結果を得た。

表 4

<b>蛋白</b> pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5 重量多α <sub>81</sub> カゼイン	0	0	ŷ	0	<u></u>
10重量第115グロブリン	0	0	0	×	×

◎:即座にゲル化

○:ややゲル化に時間を要した

×:溶液のまま

#### 実施例 6

直径 9.3 mm、高さ 1.5 mmのテストピース作成容器に試料溶液 1 mlを流し込み、下記に示す様にケル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオログラム(東洋精複製作所㈱、C V - 1 0 0 )にて、1 8 から 2 5 でまで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

## ① ゼラチン冷却ゲル

10重量が榕被となるように、ゼラチンに水 を加え、60で、3分で完全にゼラチンを溶解 後、1 xtをテストピース作成容器に流し込み、 3 でにて 2 0 分放置し、ゲル化させ室温に戻し て搬定した。

#### ② ゼラチンTGase ゲル

ゼラチンに10重量手務液となるように0.1 Mトリス塩酸溶液(5 mM CaCia、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6 )を加え、60 ℃、3分で完全にゼラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスグルタミナーゼをゼラチン1 町に対して0.1 ユニントの割合で加え、室温に1時間放置しケル化させ、測定した。

結果を図1に示す。ゼラチン冷却ゲルは温度が 増加するとともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、 それに比してゼラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかつた。

### 実施例 7

 $\alpha_{s1}$ カゼインについては  $\delta$  重量多、大豆 1.1.Sグロブリンについては 1.0 重量多となるように

## 4 図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、機軸は 温度(で)、縦軸は貯蔵弾性率(dyn/od))であ り、実線は本発明のゼラチンTGaseゲルを、破 線はゼラチン冷却ゲルを示す。

特許出頭人 味の素株式会社

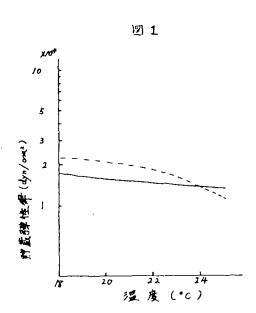
0.1 Mトリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCla、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)でし起を調製し、これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 町に対して 0.1 ユニットを加えゲルを得た。このゲルを、さらに100 でに20分間保つた後、室温まで冷却した。

ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲルについてレオメーター(不動工業網、NRM-2002])で、ブランジヤー(50、ボール型)を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度とした。結果を表5に示す。

麦 5

蛋白	未加 熱	加熱処理後
5重量第α 61 ゲル	1 2.0 9	2 5.6 9
10重量第11.5ゲル	2.8 🕫	3 7.0 9

上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理 した方がゲル強度が増加した。



#### 手械補正書

#### 昭和57年10月6日

#### 特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1、事件の表示

昭和57年特許顧31978号

2. 発明の名称

ゲル化物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

取締役社長 歌田 勝弘 🕻

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により増加する発明の数 な し

6、補正の対象 明報書の発明の詳細な説明の機



- 7. 補正の内容
- (1) 明編書第6頁第12行の「Protecn」を「Protein」に補正 まる

- (2) 明柳書第9頁第7行の「5m M・トリス」を「5m M トリス」に補正する。
  - (3) 明朝書第10頁第14行の「Gcl」を「Gel」に補正する。
- (4) 明観書第11頁表1の牛乳蛋白②Na ーカゼイネートの欄の「化学機及び」を「化学機)及び」に補正する。
- (5) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na +カゼイネートの難の「Dacry」を「Dairy」に補正する。
- (6) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na ーカゼイネートの個の「共器機))」を「共益機)」に補正する。
- (7) 明朝編第12頁表1の大豆蛋白11Sグロブリンの欄の「クレーク」を「フレーク」に補正する。
- (8) 朝棚書第16頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。
- (9) 明細書第17頁表3編外の「△:ゲルする」を「△:ゲル化する」に補正する。
- (10) 明相書第17頁下から第7行の「Call<sub>2</sub>」を「Ca Cl<sub>2</sub>」に補正する。
- (11) 明報書第17頁下から第5行の「讚整」を「調製」に補正す 5\_
- (12) 明報告第18頁下から第9行の「高さ1.5mm」を「高さ 1.5mm配配」に補正する。